

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-504683

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)5月25日

(51) Int.Cl.
A 6 1 K 39/39

識別記号 庁内整理番号
9284-4C

F I

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-503433
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)7月7日
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)1月9日
(86) 国際出願番号 PCT/US93/06298
(87) 国際公開番号 WO94/01133
(87) 国際公開日 平成6年(1994)1月20日
(31) 優先権主張番号 910,399
(32) 優先日 1992年7月8日
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 シェリング・コーポレーション
アメリカ合衆国ニュージャージー州07033,
ケニルワース, ギャロッピング・ヒル・ロ
ード 2000
(72) 発明者 ボネム, エリック・エム
アメリカ合衆国ニューハンプシャー州
03057, マウント・ヴァーノン, レミント
ン・ロード 20
(72) 発明者 チャウドリー, イムティアズ, エイ
アメリカ合衆国ニュージャージー州07006,
ノース・コールドウェル, ローズ・アベニ
ュー 18
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GM-CSFのワクチンアジュバントとしての利用

(57) 【要約】

本発明は、ワクチンと共に有効量のGM-CSFを哺乳類に投与することを含む、ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法である。本発明はさらに、有効量のGM-CSF、天然、合成または組み換え体抗原および薬学的に受容しうるキャリアーを含む医薬組成物を提供する。

請求の範囲

明細書

GM-CSFのワクチンアジュバントとしての利用

1. ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法であって、ワクチン接種を必要とする哺乳類に対して、有効量のGM-CSFをワクチンと共に投与することを含む方法。
2. ワクチンがB型肝炎ワクチンおよびインフルエンザワクチンからなる群より選択される、請求項1記載の方法。
3. 投与されるGM-CSFが徐放製剤内に含まれる、請求項1記載の方法。
4. ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強するためのGM-CSFの使用。
5. ワクチンに対する免疫反応を増強するための薬剤の製造のためのGM-CSFの使用。
6. ワクチンが、B型肝炎ワクチンおよびインフルエンザワクチンからなる群より選択される、請求項4または5に記載の使用。
7. GM-CSFが徐放製剤中に含まれる、請求項4または5に記載の使用。
8. 有効量のGM-CSFおよびワクチンを含む医薬組成物。
9. GM-CSFが徐放製剤内に含まれる、請求項8記載の医薬組成物。
10. ワクチン中の抗原に対する哺乳類の免疫反応を増強するためのキットであって、GM-CSFおよびそのための薬学的に受容しうるキャリアーの医薬組成物の容器、およびワクチンおよびそのための薬学的に受容しうるキャリアーの医薬組成物の容器を含むキット。
11. GM-CSFが徐放製剤内に含まれる、請求項10記載のキット。

発明の分野

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)、特にヒトGM-CSFの、ワクチンアジュバントとしての利用に関する。

発明の背景

自動免疫化とは、動物に免疫反応をもたらすためにその動物に抗原を投与することである。微生物に対するワクチンとは、非免疫個体に接種された時に、その微生物に対する自動免疫を誘発するもたらさない抗原調製物である。特異性と記憶という二つの適応免疫システムの鍵となる要素は、その適応免疫システムが抗原に対して二回目に遭遇したときに非常に強い反応を増やすため、ワクチン接種によって開発される。この二次性の免疫反応は、一次性的反応よりも早く出現しより効果的である。ワクチン開発の原理は、抗原性を失うことなく無害化するように微生物もしくはその毒(天然抗原)を変化させることである。あるいは、問題となる生命体の抗原ポリペプチドを、遺伝子組み換え法または合成化学によって生産し、有効なワクチンを生産することができる。

自動免疫化の過程においてしばしば遭遇する一つの問題は、ワクチンに使用される抗原が、続く感染に対して防御を提供するために、または長期間に渡ってこのレベルを上げる能力を維持するために十分なレベルの抗体のタイターを生ずるのに十分な免疫原性を有していないことである。もう一つの問題は、そのワクチンが、バクテリアおよびウイルス感染に対する一次性的免疫防御である細胞性免疫を誘導できないであろうということである。さらにもう一つの問題は、個々の患者は免疫抑制状態にあるかもしれないということである。

より強い体液性および/または細胞性免疫を得るために、ワクチンをアジュバントを含む製剤中で投与することが一般的である。アジュバントとは、抗原に対する免疫反応を非特異的に増強する、もしくはアジュバントなしでは抗原に反応しない個体を抗原に反応するようにさせる物質である。アジュバントは普通、抗原と共に投与されるが、抗原投与の前または後に与えてもよい。哺乳類のワクチ

ン接種に適切なアジュバントは、アジュバントB5(ビーナツオイル、マンニトモノオレイン酸エステル(mannide monooleate)、モノステアリン酸アルミニウムを含む);フロインド(Freund's)完全または不完全アジュバント;水酸化アルミニウム、燐酸アルミニウム、みょうばん等の無機物ゲル;ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、N,N'-ジオクタデシル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシメチル)-プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびブルロニックポリオール等の界面活性剤;ビラン、硫黄デキストラン、ポリIC、ポリアクリル酸およびカルボキシル等のポリアニオン;ムラミルジペプチド、ジメチルグリシンおよびタフツシン等のペプチド;およびオイルエマルジョンを含むが、これらには限定されない。抗原はまた、リポソームまたは他のマイクロキャリアーに取り込ませて投与することができる。

発明の要約

書くべきことに、顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)が効果的なワクチンアジュバントであることが発見された。

したがって、本発明は、ワクチン接種の必要な哺乳類に対して、有効量のGM-CSFをワクチンと共に投与することを含む、ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法を提供する。

好ましくは、処置される哺乳類はヒトであり、使用されるGM-CSFはヒトのアロタイプの一つである。好ましくは、GM-CSFはワクチンの投与の1から14日前または1から14日後に、約0.1から100 μ g/kg体重が投与される。

本発明はさらに、有効量のGM-CSF、天然、合成または組み換え体抗原および薬学的に受容しうるキャリアーを含む医薬組成物を提供する。

本発明はまた、その中に含まれるGM-CSFの医薬組成物を有する第一の容器、およびその中に含まれるワクチンの医薬組成物を有する第二の容器を含む、ワクチン中の抗原に対する哺乳類の免疫反応を増強するためのキットを提供する。

発明の詳細な説明

本明細書に引用される参考文献の教示をすべて、本明細書の一部としてここに引用する。

本発明によれば、我々は書くべきことに、ワクチンと共に有効量のGM-CSFを投与することにより、哺乳類、特にヒトのワクチンに対する免疫反応を効果的に増強しうることを発見した。本明細書において使用される「と共に」という用語は、GM-CSFをワクチンの投与と同時に、前もってまたは後に投与することを指す。

本明細書において使用される「GM-CSF」は、(a)Leeら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4360(1985))に記載される成熟型(すなわちシグナル配列を欠く)ヒトGM-CSFの配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有する、および、(b)天然型GM-CSFに共通の生物活性を有する蛋白質を意味する。

アミノ酸の実質的な同一性は、配列が同一であるか、または生物活性を実質的に備わらない一つ以上のアミノ酸の置換(欠失、挿入、置換)によって異なっていることを意味する。ヒトGM-CSFの間では、塩基配列およびアミノ酸のヘテロジェナイティが観察されている。たとえば、ヒトGM-CSFのN末端に於いて第100位のアミノ酸の位置で、スレオニンとイソロイシンの両方が観察されている。また、Schriberら(Biochem. J. 247:195 (1987))は、第80位のメチオニン残基がイソロイシン残基によって置換されているヒトGM-CSFの実質体を報告している。マウスおよびチナガザル(わずかに3つのメチオニンを有する)およびラット等の他種のGM-CSFもまた本発明の意図するものである。原核生物の発現システムで生産される組み換え体GM-CSFはまた、当該技術分野において良く知られるように、追加のN末端メチオニン残基を有しうる。糖化されているか(すなわち、天然資源由来または真核生物発現システム由来)、または糖化されていない(すなわち、原核生物発現システム由来または化学合成)のどちらであろうか、実質的な同一性の要求に合致するいかなるGM-CSFも含まれる。

本発明において使用されるGM-CSFは、天然資源から得ることができる(米国特許No. 4,438,032:Gassonら、同上;Burgessら、同上;Sparrowら、同上;Vuら、同上)。天然に存在するGM-CSFと実質的に同一のアミノ酸配列および活性を有するGM-CSFを本発明において用いることができる。GM-CSFの相補的DNA(cDNA)は、多くの研究室、例えばGoughら、Nature:309:763 (1983)(マウス);Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4360 (1985)(ヒト);Fongら、Science, 228:810 (1985)(ヒトおよびチナガザル);Cantrellら、Proc. Natl. Acad. Sci.

特表平7-504683 (3)

USA, 82:6250 (1985) (ヒト) によりクローンされ塩基配列が決定された。

GM-CSFはまた、Immunex, Inc. (Seattle, Washington), Schering-Plough Corporation (Kenilworth, New Jersey) およびGenzyme Corporation (Boston, MA) から得ることができる。

アジュバント活性は、さもなくばワクチンに対してまったく反応しないであろう個体の免疫反応の発達による、免疫を介する防御の有意な増加によって明らかに示される。体液性免疫の増強は、その抗原に対する抗体のタイターの有意な増加によって典型的に示される。

ワクチンと共にGM-CSFを投与することを提供する本発明の方法は、以下の優位性を有する。GM-CSFの存在下ではより少ない抗原が少なくとも通常の量のワクチンの投与で達成されるのに匹敵する免疫反応を引き出すであろうことにより、投与されるワクチンの全体の抗原負荷を減少することができる。本発明にしたがってGM-CSFを投与することにより、ワクチン接種毎により少ない抗原が必要とされるため、現在使用されているいくつかのワクチンにともなう望ましくない副作用の可能性を減少することができる。

ワクチン接種に対してあまり反応しないあるタイプの個体の免疫反応は、ワクチンと共にGM-CSFを投与することにより増強される。本発明の方法により悪影響を受けるべき個体のタイプは、(1) 免疫反応が傷害されているタイプ、(2) 正常に見えるにもかかわらずあるワクチンに対して反応しない個体、ならびに(3) 放射線照射および化学療法等の免疫を抑制する治療を受けている個体を含む。

このように我々は、(1) ワクチン中に存在する抗原に対する哺乳類における効果的な一次免疫反応を増強する、(2) ワクチン中の抗原にさらされた哺乳類における効果的な抗体レベルを増強する、および(3) GM-CSFの投与なしにはその哺乳類による免疫反応が十分に強くまたは十分に早く病気を防ぐことができない場合に、ワクチン中に存在する抗原に対する哺乳類における一次免疫反応を増強するための効果的な方法を見出した。

本発明にしたがって使用されることが意図されるワクチンには、自衛免疫化に使用されるバクテリアワクチン、トキソイドワクチン(非活性化毒)およびウイルスワクチンまたはこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されるものでは

ない。例えば、"Immunizing Agents" in Remington's Pharmaceutical Sciences 14th Edition 1990 Mack Publishing Co. の75章、1426ページから1441ページおよび、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration) によって認可され Physician's Desk Reference, 46th Ed. 1992の208ページから209ページ(産物分類インデックス)に記載されている抗毒素、トキソイド、ワクチンおよび生ワクチンを参照のこと。適切なバクテリアワクチンは、以下のような疾患の本体または状態に対するバクテリアワクチンを含む: コレラ、百日ぜき、ペスト、腸チフス、副傷寒、肺炎、*E. influenzae* タイプB、らい病、りん病、グループB髄膜炎、グループB連鎖球菌、グラム陰性敗血症、大腸菌敗血症および緑膿菌。適切なトキソイドは、ジフテリア毒、ボツリヌス毒および破傷風毒素を含む。適切なウイルスワクチンは、以下のような疾患の本体または状態に対する生または非活性化ワクチンを含む: 小児マヒ、風疹、黄熱、麻疹、B型肝炎、C型肝炎およびインフルエンザ。

適切な「多種抗原」は、ジフテリアおよび破傷風トキソイド、ジフテリア、百日ぜきおよび破傷風トキソイドの三重抗原(例えばConnaught Laboratories Inc. Swiftwater, PA 18370から入手可能)を含む。異なる国々で使用される広範囲のウイルス株および細胞基質、および様々な免疫スケジュールは、White, D. O. and Fenner F., Medical Virology 3rd Edition (Academic Press 1986)に開示されている。

さらに、典型的にはGM-CSFは、弱い(すなわちレベル、程度および、または期間の面で減少した)防御を提供する)と考えられる動物またはヒトワクチンによって与えられる防御を増強するために使用される。そのようなワクチンの例としては、ボルデテラ細菌ワクチン、大腸菌細菌ワクチン、ヘモフィルス細菌ワクチン、レプトスピラ細菌ワクチン、モラクセラ細菌ワクチン、バネツセラ細菌ワクチン、ビブリオ細菌ワクチン、肺炎球菌、およびB型肝炎、A&Bインフルエンザ、牛呼吸器ワクチン、感染性牛鼻気管炎、パラインフルエンザ3、呼吸器シンシチウムウイルス、牛ウイルス性下痢ワクチン、馬インフルエンザワクチン、猪白血病ワクチン、猪呼吸器ワクチン、鼻気管炎カリチ肺炎ウイルス、イヌパロウイルスワクチン、伝染性胃腸炎ワクチン、伝染性犬病ワクチンおよび狂犬病ワクチン

等の感染性または死滅ウイルス産物または組み換え体抗原性ウイルス産物がある。

本発明にしたがって投与されるGM-CSFの効果的な量に関して本明細書において使用される「有効量」という用語は、ワクチンがGM-CSFなしで投与されるよりも感染物質からの増加した防御を提供するのに十分な抗体レベルの増加をもたらすGM-CSFの量を意味する。しかしながら、有意な抗体レベルの増加は比較的小さいかもしれないことに注意しなければならない。投与されるGM-CSFの有効量は、体重kgあたり0.1から500 μ gのGM-CSFである。さらに好ましくは、投与される有効量は体重kgあたり1 μ gから100 μ gであり、最も好ましくは5から50 μ gのGM-CSFである。

投与の量、頻度および期間は、特異的な抗体タイターのレベル、誘導される抗体のクラス、ワクチンのタイプ、ならびに患者の年齢および一般生体状態等の因子に依存して変化する。GM-CSFは、ワクチン投与の前、同時または後に投与することができる。好ましくは、GM-CSFの用量がワクチン投与の1から14日前に患者に投与される。最も好ましくは、GM-CSFはワクチン投与の24時間前または後に投与される。

GM-CSFはワクチンと混合して投与してもよいが、通常はワクチンとは別に投与される。GM-CSFをワクチンと混合する場合には、投与される組成物は、ある病原体または抗原に特異的な反応を引き出すのに有効な免疫原、薬学的に受容しうるワクチンのキャリアーおよび免疫を増強しうる量のGM-CSFを含む。GM-CSFの投与は、皮下、静脈内、腸管内、筋肉、または他のいかなる受容可能な方法によっても行うことができる。好ましくは、GM-CSFは、ワクチンの投与前に、ワクチンが投与される部位と同一の部位に投与される。上記の投与形式によって意図される製剤および医薬組成物は、一般に薬学的に受容しうる賦形剤および添加物と共に、一般的な技術により調製することができる。他のアジュバントを、ワクチンと共にまたはワクチンとGM-CSFと共に投与してもよい。

もし、ワクチンを一定の期間にわたって複数回投与する場合には、後のワクチンの投与毎に追加のGM-CSFを共に投与しうる。ワクチンの後の投与毎に共に投与されるGM-CSFの量は、最初のワクチンと共に投与されるGM-CSFの量より多いか、

同じかまたは少なくともよい。ワクチンの後の投与毎に共に投与されるGM-CSFの量は、最初のワクチンの投与後の患者の抗体反応に依存するであろう。

投与されるGM-CSFの溶液は、凍結乾燥した粉末から再構成され、さらに防腐剤、緩衝液、分散剤等を含むことができる。好ましくは、GM-CSFは、通常皮下投与に使用される等張媒体、例えば防腐剤を含まない滅菌水で再構成される。

薬物のより長い血清半減期をもたらすようなGM-CSFの徐放製剤を投与することもできる。そのような製剤の例は以下のとおりである。

製剤1

成分

凍結乾燥GM-CSF	10-1000mcg
酢酸亜鉛	4.0mg
硫酸プロタミン	2.5mg
水酸化ナトリウム	0.6mg
注射水(充分量)	1ml

製剤1にしたがってGM-CSFの徐放製剤を製造するためには、凍結乾燥したGM-CSFを一部の注射水に溶解し、水酸化ナトリウムを用いてpHを8.2に調整する。硫酸プロタミンを加えて混合物を攪拌し、次に酢酸亜鉛を加えて混合物を再び攪拌する。残りの注射水で全溶液を最終体積に合わせる。好ましくは、水酸化ナトリウム、硫酸プロタミンおよび酢酸亜鉛は温度の高い水溶液(例えば、プロタミンなら25mg/mlの水溶液を100 μ l)として加える。

製剤2

成分

凍結乾燥GM-CSF	10-1000mcg
再構成のための注射水	0.2ml
ジオクチルナトリウムスルホスクシネート	1mg
エマルジョン用ビーナツオイル	2ml
ゲル用ビーナツオイル	2ml
モノステアリン酸アルミニウム	50mg

製剤2にしたがってGM-CSFの徐放製剤を製造するためには、モノステアリン

酸アルミニウムをゲル用ビーナツオイルに混合し、公知の方法にしたがってゲルを形成するために温度を上昇させる。

ジオクチルナトリウムスルホスクシネートを注射水に溶解する。凍結乾燥したGM-CSFを、ジオクチルナトリウムスルホスクシネート溶液で再構成し、得られる溶液をエマルジョン用ビーナツオイル中に移してボルテックスにより混合する。得られるエマルジョンを前に調製したゲル化したビーナツオイル中に混ぜて、ボルテックスにより混合する。

製剤3

成分	
凍結乾燥GM-CSF	10-1000mcg
酢酸銅	0.2mg
硝酸二ナトリウム	2.27mg
硝酸一ナトリウム	0.55mg
水酸化ナトリウム	0.6mg
注射水(充分量)	1ml

製剤3にしたがってGM-CSFの徐放製剤を製造するためには、硝酸一ナトリウムおよび硝酸二ナトリウムを一部の注射水に溶解する。次に凍結乾燥GM-CSFをこの溶液に溶解し、水酸化ナトリウムによりpHを7.8に調整する。次に酢酸銅を加え、溶液を攪拌する。残りの注射水でこの溶液を最終体積に合わせる。好ましくは、水酸化ナトリウムおよび硝酸銅は濃度の高い水溶液(例えば、硫酸銅なら2g/mlの水溶液を100μl)として加える。

別の徐放製剤

GM-CSFの別の徐放製剤は、ポリアンヒドリド、ポリホスファジン、コラーゲン、アルギネート、ポリ(メタクリレート)、ゼラチン、ポリ(ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクトン)、エチレンビニルアセテートまたはポリラクチドグリコリド等のポリマーを使用して調製したGM-CSFの微小カプセルまたはマイクロスフェアを使って調製することができる。

GM-CSFの徐放製剤はまた、ポリエチレングリコール、デキストランポリ(アミノ酸)および他の同様なポリマーを使用してGM-CSFの化学コンジュゲートとして

0.5	710
5.0	0
5.0	35
5.0	125
5.0	920
5.0	2600
10.0	0
10.0	0
10.0	440
10.0	7240

* 1単位は、標準ELISAで最大反応の半分の反応をもたらす血清希釈率の逆数として定義される。

上記に示されたデータに見られるように、GM-CSFは、B型肝炎ワクチンと共に使用される効果的なアジュバントであった。

実施例2

組み換え体ヒトGM-CSFは、高齢患者におけるインフルエンザウイルスワクチンの効果を増強することが示された。

汎流行性(インフルエンザA)および流行性(インフルエンザB)の間に生ずるヒトインフルエンザウイルスは、慢性疾患を有している高齢者のみならず、明らかに健康な高齢者においても重大で過度な疾病率および死亡率を引き起こす。インフルエンザワクチンは、疾病率と死亡率の両方を減少させる意思を提供することが示されているため、インフルエンザワクチンは、インフルエンザ関連の合併症を生ずる危険性が高い患者に強く推奨されており、危険性が高い患者にワクチン接種を行う努力に毎年多大な財源が費やされている。

しかしながら、大規模な免疫プログラムにも関わらず、インフルエンザは高齢者において病気の重大な原因の一つとして留まっている。2から3回の標準ワクチン投与または最初の投与後1ヶ月でのブースター投与等のいくつかの方法は、高齢者のインフルエンザワクチンに対する免疫反応を改善することはないことが

調製することができる。

ワクチンの免疫反応を増強するGM-CSFの効果は、以下の非限定性的ヒト臨床データによって例証されるが、本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

実施例1

組み換え体ヒトGM-CSFは、B型肝炎ワクチンに反応しなかった透析患者の組み換え体B型肝炎ワクチンの効果を増強することが示された。

本実験の目的は、GM-CSFと肝炎ワクチンの同時投与が、以前肝炎ワクチン接種に反応しなかった腎疾患を持つ患者に対する免疫反応を回復しうるかどうかを決定することであった。

少なくとも3回のB型肝炎ワクチンの接種の試みにおいて、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)に対する抗体タイターから判断して反応しなかった15人の透析患者をGM-CSFで処置した。8人の患者は、患者の体重kgあたり0.5μgのGM-CSF(Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USAによって大腸菌発現システムで生産されたもの)を皮下に投与され、5人の患者は、患者の体重kgあたり5μgのGM-CSFを投与され、4人の患者は、患者の体重kgあたり10μgのGM-CSFを投与され、そして投与部位に印をつけた。GM-CSFの投与後24時間において、患者はそれぞれ、GM-CSFを投与された場所と同じところに40μgのB型肝炎ワクチン、BBVax(登録商標)(Verck, Sharp and Dohme, Gabh, Darmstadt, Federal Republic of Germany)を投与された。ワクチン投与の4週間後、患者から血液サンプルを採取し、サンプルを抗B型肝炎抗体の存在について調べた。結果は以下の表に示す。

GM-CSFの用量(μg/kg wt.)	表1 HBsAgに対する抗体タイター *単位/liter
0.5	0
0.5	0
0.5	0
0.5	0
0.5	0

示されている。

したがって、インフルエンザワクチンへの免疫反応が組み換え体GM-CSFの投与によって増強されるかどうかを決定するために、二重盲検でブラシーボを対照とした用量上昇試験が行われた。組み換え体GM-CSF(Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USAによって大腸菌発現システムで生産されたもの)の5つの異なる用量、すなわち0.25、0.5、1、2.5、5μg/kgを、ブラシーボとの比較において試験した。60人の健康な高齢被験者が対象となった。対象者は、フランス製1992-1993の三価混合されたインフルエンザワクチン(A/シンガポール/6/86[H1N1]、A/北京/353/89[H3N2]およびB/山形/16/88)(Pasteur Vaccins, Marnes-la-Coquette, France)を片方の腕に筋肉内投与される直前に、組み換え体GM-CSFまたはブラシーボを他方の腕に皮下投与された。特異的な血球凝集素阻害(HAI)抗体の3つのインフルエンザウイルス株に対するタイターを、ワクチン投与前、ワクチン投与後1、3および6週間において決定した。インフルエンザワクチンと共にブラシーボ投与された15人の患者の内一人も、3つ全ての株のインフルエンザワクチンに対する同時血清転換を示さなかったが、2.5および5μg/kgの組み換え体GM-CSFを投与された9人の患者の内、5人(55%)および3人(33%)が3つ全ての株に対して血清転換した。

使用されたプロトコルを、以下により詳細に記述する。

材料および方法

患者の選択 患者は健康な高齢者で両性を含み、少なくとも65才であった。ボランティアは、病歴および、完全な血球細胞数計測、生化学、尿検査および血清検査を含む試験室検査により資格審査された。対象者は、A-H1N1およびBインフルエンザで1:40以下の血球凝集素阻害(HAI)抗体のタイターを、およびフランス製1992-1993インフルエンザワクチン中に含まれるA-H3N2インフルエンザ株で1:80以下のタイターを持っていなければならない。激しいかまたは不安定な慢性的疾患または悪性腫瘍を持つ対象者、抗凝剤または免疫抑制薬を服用している対象者、試験室検査による審査で重大な異常な結果を示した対象者、即に対するアレルギーを持つ対象者、過去6ヶ月間にインフルエンザ様の両度がある対象者、または試料採取の際に急性の病気があった対象者は、試験から除外された。

特表平7-504683 (5)

治療デザイン 治療は、二重盲検、プラシーボ対照、用量設定試験として設計した。

薬物投与およびワクチン接種 この治療に参加した60人の対象者は、12人毎に5つのグループに分けられた。各グループは単回の0.25、0.5、1、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の組み換え体GM-CSFまたはプラシーボを投与された。全ての対象者は、A/シンガポール/6/86(H1N1)、A/北京/353/89(H3N2)およびB/山形/16/88 (Pasteur Vaccins, Marnes-la-Coquette, France) からのHAsを各15 μg を含む、ライセンスを与えられた1992-1993三種サブビリオン (trivalent subvirion) ワクチン0.5mlを左腕の三角筋の範囲に筋肉内投与された直後に、組み換え体GM-CSFまたはプラシーボを右腕の三角筋の範囲に皮下投与された。

試料採取 血清およびウイルス培養のための咽拭綿棒は、治療の開始前、ワクチン接種後1、3および6週間に各対象者から得た。

血清抗体 インフルエンザA/シンガポール(H1N1)、A/北京(H3N2)およびB/山形ウイルス抗体に対するHAI抗体は、標準的な血球凝集阻害アッセイによって血清試料中で測定した。6週目までに採取された血清の予備的な解析の結果は、同一の試薬を使用して、同一日に全ての試料を試験して得た。最初の希釈は1:20であった。1:20以下のHAI抗体のタイターは、「検出不能」なタイターと定義した。

統計解析 抗体タイターに従った成功は、2つの異なる方法において定義された：

- 血清転換 (Seroconversion) : 6週目における、投与前に対するHAI抗体タイターの4倍の増加
- 血清防御 (Seroprotection) : 投与前より高く、かつ、少なくとも6週目に於いて1:40に等しいHAI抗体タイター

これらの定義に基づいた成功の数は、フィッシャーの検定法 (Fisher's exact test) を使用して解析した。異なる用量群のプラシーボ群は一緒にまとめた。

結果

対象者の特性 本試験に参加した60人全ての健康年齢ボランティアは、6週目の評価を終了した。表3は、投与前のHAI抗体タイターを示す。ほとんどの対象者

は、投与前のHAI抗体タイターが防御レベルより低い、すなわち1:40以下であった。投与前タイターの分布は、ほとんどの患者が検出限界以下の抗体タイターであった0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群を例外として、全ての処置群で同等であった。

免疫反応 表4は、GM-CSFまたはプラシーボおよびインフルエンザワクチンを投与後6週において、3つ全ての株に対して血清転換を起こした患者の数を示す。結果はまた、各株毎に分けて示される。

インフルエンザワクチンと共にプラシーボを投与された15人の対象者の内では、一人も3つ全てのインフルエンザウイルス株に対して同時に血清転換することはなかったが、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の組み換え体GM-CSFで処置された9人の内5人 (56%)、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の組み換え体GM-CSFで処置された9人の内3人 (33%) が3つ全ての株に対して血清転換した。さらに、各インフルエンザ株に分けて調べた時の結果では、2.5と5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の組み換え体GM-CSFでの血清転換率は一貫してプラシーボ群 (13%から20%の範囲) で観察されたよりも高かった (44%から67%)。興味深いことに、最も低い用量群 (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で観察された血清転換率は、0.5または1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で観察された率より高かった。

表5に示すごとく、この結果の結論は、“血清防御”を成功の定義として使用した場合にも変わらない。予測されたように、血清防御は血清転換より達成することが容易であるため、血清防御率は全ての処置群において血清転換率より高い。ここでもまた、組み換え体GM-CSFで処置された患者はプラシーボで処置された患者よりもインフルエンザワクチンに対する免疫反応率で高い値を示した。事実、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で処置された患者9人の内5人 (56%)、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で処置された患者9人の内3人 (33%) が3つ全ての株に対して防御された一方、プラシーボで処置された15人の内1人 (7%) のみが3つ全ての株に対して血清防御した。

表2・試験デザイン

	対象者の数	
	CSF 39300	プラシーボ
グループ I: 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3
グループ II: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3
グループ III: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3
グループ IV: 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3
グループ V: 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3

表3: 投与前のHAI抗体のタイター。表は3つのインフルエンザ株それぞれに対するHAI抗体のタイターに示したから75名処置群全中の対象者の数を示す。

	投与前におけるHAI抗体のタイター									
	A/シンガポール					A/北京				
	<1:20	1:20	1:40	1:80	1:160	<1:20	1:20	1:40	1:80	1:160
CSF 39300 + インフルエンザワクチン	5	6	4	4	1	10	4	1	1	2
プラシーボ + インフルエンザワクチン	4	3	2	1	2	6	1	2	5	4
0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1	5	3	7	1	1	1	4	1	4
0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	4	3	4	3	2	4	2	3	3
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	4	1	2	6	2	1	4	5	1
2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	4	1	2	6	2	1	4	5	1
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	1	1	1	8	1	1	8	1	1

表4: 血清抗体価の経路。血清抗体価は投与前のHAI抗体価の4倍の増加として算定される。第2回目のワクチン接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。第3回目の接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。第4回目の接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。

ワクチン	第1回目の接種後			第2回目の接種後			第3回目の接種後			第4回目の接種後		
	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形
プラシノーインフルエンザワクチン	0/15 (0%)	2/9 (22%)	4/9 (44%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)
CSF 39300 + インフルエンザワクチン	0.35 µg/kg	0.9 (0%)	2/9 (22%)	3/15 (20%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)	3/15 (20%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)	3/15 (20%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)
0.5 µg/kg	1 µg/kg	1 µg/kg	2/9 (22%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)	2/9 (22%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)	2/9 (22%)	3/9 (33%)	1/9 (11%)	2/9 (22%)
2.5 µg/kg	5 µg/kg	5 µg/kg	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)

表5: 血清抗体価の経路。血清抗体価は投与前のHAI抗体価の4倍の増加として算定される。第2回目のワクチン接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。第3回目の接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。第4回目の接種後、HAI抗体価は3つの接種を受けた全ての接種に対して血清抗体価を示す。

ワクチン	第1回目の接種後			第2回目の接種後			第3回目の接種後			第4回目の接種後		
	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形	A/北京	A/シンガポール	B/山形
プラシノーインフルエンザワクチン	1/15 (7%)	4/9 (44%)	6/9 (67%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)
CSF 39300 + インフルエンザワクチン	0.25 µg/kg	0.5 µg/kg	1 µg/kg	3/15 (20%)	3/9 (33%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	3/9 (33%)	3/9 (33%)	3/15 (20%)	3/9 (33%)	3/9 (33%)
0.5 µg/kg	1 µg/kg	2.5 µg/kg	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	3/9 (33%)
5 µg/kg	5 µg/kg	5 µg/kg	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)	4/9 (44%)

手続修正書

平成 7年 1月 9日

特許庁長官 高品 章 殿

1. 事件の表示

PCT/US93/06298

2. 発明の名称

GM-CSFのワクチンアジュバントとしての利用

3. 修正をする者

事件との関係 特許出願人

住所

名称 シェリング・コーポレーション

4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206区

電話 3270-6641~6

氏名 (2770) 井理士 満 浅 恭 三

5. 修正の対象

請求の範囲

6. 修正の内容

別紙の通り

(1) 請求の範囲を以下の通りに修正する。

1. ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法であって、ワクチン接種を必要とする哺乳類に対して、有効量のGM-CSFをワクチンと共に投与することを含む方法。
2. 有効量のGM-CSFおよびワクチンを含む医薬組成物。
3. ワクチン中の抗原に対する哺乳類の免疫反応を増強するためのキットであって、GM-CSFおよびそのための薬学的に受容しうるキャリアーの医薬組成物の容器、およびワクチンおよびそのための薬学的に受容しうるキャリアーの医薬組成物の容器を含むキット。』

以上



フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, M N, MW, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN

(72)発明者 スタバク, エリオット
アメリカ合衆国ニュージャージー州07006,
ウエスト・コールドウェル, ウッドラン
ド・ロード 11